

抗体染色の方法を固定剤別に5種類に分類する。

水系固定剤法	(1) paraformaldehyde (PFA) method (2) paraformaldehyde / glutaraldehyde (GA) method (3) formalin method
溶媒系固定剤法	(4) methanol method
その他の固定剤法	(5) trichloroacetic acid (TCA) method

新しい抗体で染色する時は、水系固定剤法と溶媒系固定剤法の2種類の方法を用いる。(2) paraformaldehyde / glutaraldehyde (GA) methodと(4) methanol methodを最初に試みる。水系固定剤としてあげた(3) formalin methodのformalinには少量のMeOHが入っていることを考慮する。また、抗体の種類によっては水系固定剤法でも溶媒系固定剤法でも染色されない時もある。あきらめる前にその他の固定剤法としてあげた(5) trichloroacetic acid (TCA) methodを試すことを奨める。

参考までに、これまで使用したことのある抗体の中から汎用性のあるものについて固定剤別にその染色程度を抗体染色リスト(別表)に示した。リストにないものについては、実験ノート等から生情報を得ることがベストである。Labにある1次抗体の詳細内容は、「1次抗体」ファイルを見る。2次抗体については、「2次抗体」ファイルの添付資料を参考にいくつかの希釈倍率を試みる(通常、1/500-1/2,000希釈)。

現在使用している試薬について

PFA:	FORMALDEHYDE (METHANOL FREE), 16% ULTRAPURE, EM GRADE /Polyscience Inc. /18814
GA:	Glutaraldehyde (25% in water), EM GRADE / nacalai tesque / 17003-92
MeOH:	Methanol , 試薬特級 / Wako / 137-01823
TCA:	トリクロロ酢酸, 生化学用 / Wako /200-08085
Triton X-100:	Surfact Amps X-100 (10% Triton X-100) / PIERCE/ 28314
Sodium Borohydride:	テトラヒドロほう酸ナトリウム, 化学用/ Wako / 194-01471
BSA:	ALBUMIN BOVINE / SIGMA / A-3294
Glycerol :	グリセリン, 蛍光分析用特製試薬 / nacalai tesque / 17038-65
Formalin:	ホルムアルデヒド液(ホルマリン)/ Wako / 064-00406 (37% formaldehyde, 8% methanolを含む)

(1) Paraformaldehyde (PFA) Method

- Prepare cells on 35 mm glass-bottom dishes (medium volume; 2 ml)
- Add 600 µl of 16% PFA directly to 2 ml medium (final conc: 3.7%).
- Mix gently and incubate for 15 min at R.T.
- Wash 3 times with 2ml PBS for 5~10 min.
- Add 2 ml of 0.1% Triton X-100 in PBS (10% Triton X-100 as a stock sln.)
- Incubate for 5 min at R.T.
- Wash 3 times with 2 ml PBS for 5~10 min.

- Apply ~ 100 ul of 1% BSA in PBS to cells on the glass part of the dishes (**BSA Block**).
- Incubate for > 1hr at R.T.
- Remove BSA and add ~100 µl of primary antibody (in PBS + 1 % BSA).
- Incubate at 4°C, O/N
- wash with 2 ml PBS for 10min at 3~5 times.
- Add ~100 µl of secondary antibody (in PBS + 1 % BSA).
- Incubate for 3~4 hr at R.T.
- Wash 3~5 times with 2 ml PBS for 10min.
- Mount in glycerol.

- Observe.

(2) Paraformaldehyde / Glutaraldehyde (GA) Method

- Prepare cells on 35 mm glass-bottom dishes (medium volume; 2 ml).
- Add 600 µl of 16% PFA and 20 µl of 25% GA to 2ml medium (final conc: 3.7% PFA/0.2% GA).
- Mix gently and incubate for 15 min at R.T.
- Wash 3 times with 2 ml PBS for 5~10 min.
- Add 2ml of 0.1% Triton X-100 in PBS.
- Incubate for 5 min. at R.T.
- Wash 3 times with 2ml PBS for 5~10 min.
- Add 2 ml of 0.1% sodium borohydride in PBS and shake gently for 15 min.
- Discard the solution and incubate with sodium borohydride once more.
- Wash 3 times with 2 ml PBS for 5~10 min.

以下、BSA Blockから(1)と同様に行う。

(3) Formalin Method

- Prepare cells on 35 mm glass-bottom dishes (medium volume; 2 ml).
- Add 200 µl of 37% formalin to 2 ml medium (final 3.7%: 37% formalin as a stock sln.).
- Mix gently and incubate for 15 min at R.T.
- Wash 3 times with 2ml PBS for 5~10 min.
- Add 2 ml of 0.1% Triton X-100 in PBS.
- Incubate for 5 min at R.T.
- Wash 3 times with 2 ml PBS for 5~10 min.

以下、BSA Blockから(1)と同様に行う。

(4) Methanol Method

- Prepare cells on 35 mm glass-bottom dishes (medium volume; 2 ml)
- Aspirate medium.
- Add 2 ml methanol (-30°C) gently.
- Incubate for 15 min at R.T.
- Wash 3 times with 2 ml PBS for 5~10 min.

以下、BSA Blockから(1)と同様に行う。

(5) Trichloroacetic acid (TCA) method

- Prepare cells on 35 mm glass-bottom dishes (medium volume; 2 ml).
- Wash with 2 ml serum-free medium (37°C).
- Aspirate medium.
- Add 2 ml of 10% TCA in DW gently.
- Incubate for 15 min at R.T.
- Wash 3 times with 2ml PBS for 5~10 min.
- Add 2 ml of 0.1% Triton X-100 in PBS.
- Incubate for 5 min at R.T.
- Wash 3 times with 2 ml PBS for 5~10 min.

以下、BSA Blockから(1)と同様に行う。

*****Glycerol Mount Method *****

(1) Preparation of glycerol solutions (1ml volume)

- 25mg DABCOを5本の1.5 ml micro test tubesに量り取る。
- tubeにそれぞれ100, 200, 400, 600, 800ul PBSを加えてDABCOを溶かす。
- tubeにそれぞれ900, 800, 600, 400, 200ul glycerolを加えて混合し、1 mlのglycerol solutionを作る。
* glycerolはoptical microscopy gradeのものを使う。
- DAPI (final 0.5 µg/ml) を 20-80% glycerol solutions に加えて混ぜる。
*90% glycerol solutionにはDAPIは加えない。

(2) How to Mount Cells in Glycerol

- PBSを取り除き、100 μ lの20% glycerolをglass-bottom dishのglass部分の上にアプライし、shaker上で～10分間、穏やかに攪拌して、平衡化する。
- 以下、一段階濃度の高いglycerolとの交換、攪拌を繰り返す。最終的に90% glycerol中にマウント。

表. 抗体染色リスト

Antibody			(dilution)	(1) PFA	(2) PFA/GA	(3) formalin	(4) MeOH	(5) TCA
α -tubulin, TAT1	Mouse	K. Gull	(50)	○	○	○	○	—
α -tubulin, YOL1/34	Rat	Sera-Lab	(500)	△	△	△	○*	—
γ -tubulin, GTU-88	Mouse	Sigma	(500)	—	×	○	○	—
cdc2 p34	Mouse	SantaCruz	(100)	○	—	○	×	—
BrdU	Mouse	Oncogene	(100)	○	○	—	○	—
Lamin A/C, Tim92	Mouse (IgM)	松岡さん	(500)	×	×	×	○	—
Lamin B	Mouse	MatriTect	(500)	×	×	×	○	—
Tpr, 203-37	Mouse	MatriTect	(100)	—	○	○	○	—
SC-35	Mouse	Sigma	(3,000)	—	○	○	—	○
C-Myc, 9E10	Mouse	SantaCruz	(300)	—	—	—	○	—
HA, HA11	Mouse	Babco	(1,000)	—	○	○	—	—
emerin	Rabbit	赤澤さん	(500)	○	○	○	○	△
P300/CBP	Mouse	ZYMED	(1,000)	—	○	—	○	○

○ 染色良好 △ 良くない × 染色されない — 実験せず

* 染色されず (2002年8月)